

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen — Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth

**Immunchemische Untersuchungen
an Spaltprodukten
menschlicher Gammaglobuline**

Untersuchungen an Seren mit Hypergammaglobulinämie und Paraproteinämie

Inaugural — Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich—Alexander—Universität
Erlangen—Nürnberg

vorgelegt
von
Rainer Schubert
aus
Berlin

D 29

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen—Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Schiefer
Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung:

3 FEB 1971

Acta haemat. 43: 257–271 (1970)

Immunochemische Untersuchungen an Spaltprodukten menschlicher Gammaglobuline

Untersuchungen an Seren mit Hypergammaglobulinämie und Paraproteinämie

F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ und R. SCHUBERT

Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH)

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Polypeptidstruktur der Immunglobuline (Ig) von Mensch und Tier, haben mit Bezug auf die Immunglobuline des menschlichen Serums zu folgender Einteilung geführt: Das Immunglobulinsystem besteht insgesamt aus fünf Einzelfractionen, die nach der Entschliessung der World Health Organization des Jahres 1964 [33a] als IgA, IgG und IgM bezeichnet werden; inzwischen sind zwei neue Ig-Klassen nachgewiesen und charakterisiert worden, das IgD und das IgE [26, 27, 33b, 41]. Darüber hinaus wurden in Seren von Gesunden Mikrogammaglobuline (μ -Globuline) aufgedeckt [2], deren Bedeutung als Immunglobuline bisher allerdings nicht geklärt werden konnte. Schliesslich wird diskutiert, ob das C-reaktive Protein ebenfalls zu den physiologischen γ -Globulinen gerechnet werden darf [19a, b, 35, 46, 48].

Jedes der fünf erstgenannten Immunglobuline ist durch bestimmte physikalische, biochemische und immunologische Eigenschaften ausgezeichnet. Sie unterscheiden sich also hinsichtlich ihres Molekulargewichtes bzw. ihrer Sedimentationskonstanten, hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und ihrer Diffusionsfähigkeit sowie ihrer antigenbindenden Eigenschaften. Auf Grund einer Beobachtung von PORTER aus dem Jahre 1959 [37] lassen sich die vorgenannten Immunglobuline durch Papain-Einwirkung fermentativ spalten; dabei entstehen klassenspezifische sowie kreuzreagierende Polypeptidketten. Entsprechend ihrer Aminosäuresequenz wurden sie als sogenannte H- (heavy-) und L- (light-) Ketten bezeichnet. Jüngste Forschungsarbeiten haben die Struktur dieser Bruchstücke aufgezeigt.

Es ist heute bekannt, dass an die verschiedenen γ -Globulin-Bruchstücke auch klinisch interessante Eigenschaften, etwa genetische Faktoren, antigenbindende oder Paraprotein-Eigenschaften gebunden sind [1, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 28, 38, 39, 40, 52].

In vorliegender Arbeit sollten γ -Globulin-Analysen mit Differenzierung von Papain- und Zysteamin-Spaltprodukten vorgenommen werden, mit der besonderen Fragestellung der Nutzbarkeit solcher Untersuchungen für die klinische Routinediagnostik.

Material und Methodik

Untersucht wurden die Seren von einem Patienten mit chronischer Hepatitis, ferner das Serum eines Kranken mit primär chronischer Polyarthrit, weiterhin das Serum eines Patienten mit chronisch rezidivierender Asthma-Bronchitis und schliesslich das Serum eines Patienten mit γ -G-Myelom. Alle Patientenseren waren durch eine Hypergammaglobulinämie ausgezeichnet.

Die Seren wurden zunächst papierelektrophoretisch und mit der Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien (CAF) sowie immunoelktrophoretisch differenziert. Von jedem Serum wurde ferner die Gammaglobulinfraktion durch Rivanolfällung sowie durch Trennung an der DEAE-Säule von den übrigen Serumproteinfraktionen isoliert. Der Globulinkomplex wurde nunmehr jeweils mit Papain, mit Zysteamin als auch mit Papain und Zysteamin behandelt. Die Spaltprodukte wurden immunoelktrophoretisch unter Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums sowie monoklonaler Antiseren gegen die verschiedenen Ig-Subfraktionen IgA, IgG, IgM, IgD und schliesslich unter Verwendung monoklonaler Antiseren gegen H- und L-Ketten analysiert.

Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese wurde nach dem bekannten Verfahren von GRASSMANN und HANNIG [22, 44] durchgeführt.

Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien

Die CAF-Elektrophorese wurde im Prinzip nach den Angaben von KOHN [29 a-c] vorgenommen. Zur Auswertung der Farbintensitäten der elektrophoretisch getrennten und mit Amidoschwarz gefärbten Proteinfraktionen wurde der Zeiss-Integralschreiber¹ gewählt.

Immunoelktrophorese

Die Immunoelktrophorese wurde nach den Angaben von GRABAR und WILLIAMS [20, 21] in der Modifikation nach SCHEIDEGGER [42] durchgeführt. Für einzelne Analysenätze wurden darüber hinaus Agarplatten mit den Abmessungen 19 × 12 cm mit 8 Auftragestellen und 7 Antiserumkanälen verwendet.

Als *Antiseren* wurden ein handelsübliches polyvalentes Antihumanserum sowie monoklonale Antiseren gegen IgA, IgG, IgM, IgD³, aber auch gegen Fab-Fragment (=L-Ketten) und Fc-Fragment (=H-Ketten)² gewählt.

¹ Fa. Zeiss, Oberkochen.

² Polyvalentes Antihumanserum sowie Fab- und Fc-Fragment-Antisera Fa. Hyland Lab., Los Angeles Calif. USA.

³ Monoklonale Antisera der Behringwerke, Marburg/Lahn.

γ -Globulin-Darstellung

a) *Rivanolfällung*: Vorgegangen wurde nach früheren eigenen Erfahrungen [45] bzw. nach den Angaben von HOREJŠI und SMETANA [25]. Handelsübliches Rivanol⁴ wurde als 0,7%ige wässrige Lösung verwendet. 1 ml des zu untersuchenden Serums wurde mit 2,5 ml der Rivanol-Lösung versetzt. Die entstandene Fällung wurde 30 min bei 4500 Upm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand konnte ohne Dialyse weiter verarbeitet werden.

b) *Abtrennung über die DEAE-Zellulosesäule* [24]. Angewandt wurde im Prinzip das Ionenaustauscherverfahren nach PETERSON und SOBER [36, 50]. Nach Aufbereiten der DEAE-Zellulose und Packen der Säule ($2,5 \times 40,0$ cm) bis Höhe 17,0 cm wurde die Säule dreimal mit einem Phosphatpuffer (I) pH 7,0 equilibriert. Danach wurde die Säule mit 3,0 ml der Serumprobe überschichtet. Nach völliger Aufnahme des Serums von der Säule wurde mit einem anderen Phosphatpuffer (II) pH 6,5 die Säule aufgefüllt. Dies wurde sooft wiederholt, bis die erste γ -Globulinfraktion eliminiert war. Eine auf gleiche Weise gewonnene zweite Fraktion enthielt γ - und β -Globulin-Komponenten.

Puffer I: 0,0175 M, pH 7,0; 100,0 ml NaH_2PO_4 ; 8,5 ml Na_2HPO_4

Puffer II: 0,0175 M, pH 6,5; 100,0 ml NaH_2PO_4 ; 2,6 ml Na_2HPO_4

Papainisierung

Die beiden γ -Globulinproben (die nach Rivanolfällung sowie die nach Trennung an der DEAE-Säule) jedes Serums wurden den nachfolgenden Behandlungen unterzogen: Jede Probe wurde zunächst mit Papain versetzt, wobei im Prinzip nach den Angaben von PORTER [37, 38] vorgegangen wurde: Nach einer Gesamteiweissbestimmung mit dem Autoanalyser wurden die Proben mit Papain und einem Puffer versetzt. Das Mengenverhältnis betrug 1 mg Papain auf umgerechnet 100 mg Eiweiss. Der Puffer bestand aus 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0, 0,01 M Cystein und 0,002 M Äthylendiamintetraacetat. Dieses Gemisch wurde bei 37°C für die Dauer von 1 h inkubiert. Anschliessend wurden die einzelnen Proben 4 h lang gegen 100 ml eines 0,01 M Phosphatpuffers pH 7,6 und danach gegen 1000 ml desselben Puffers 24 h dialysiert.

Behandlung der Proben mit Zysteamin

Im Hinblick auf das bei DEUTSCH und MORTON [7, 8, 53] beschriebene Verfahren wurde folgendermassen vorgegangen: Eine 1 M Zysteaminlösung in SÖRENSEN-Puffer pH 7,2 und 0,065 M wurde jeweils 1:10 mit der γ -Globulin-Probe verdünnt. Das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschliessend 2 h dialysiert gegen 0,02 M Monojodacetat.

Resultate

Befunde bei Aufbereitung bzw. γ -Globulingewinnung der Patientenserum. Bei Vergleich der γ -Globulin-Präparate nach Rivanolfällung sowie nach Trennung an der DEAE-Säule, ist zunächst festzustellen, dass beide Methoden eine relativ gute Ausbeute hinsichtlich der γ -Globulinfraktion ergaben. Bei beiden Methoden waren allerdings auch Verunreinigungen durch ein bis zwei Komponenten des β -Bereiches und in Einzelfällen sogar durch α_2 -Globulinfraktionen nicht zu vermeiden. In Fällen mit relativ hoher γ -Globulin-Konzentration, z. B. beim γ -G-Myelom, aber auch bei der chronischen Hepatitis, war der Reinheits-

⁴ Rivanol Hoechst DAB 6.

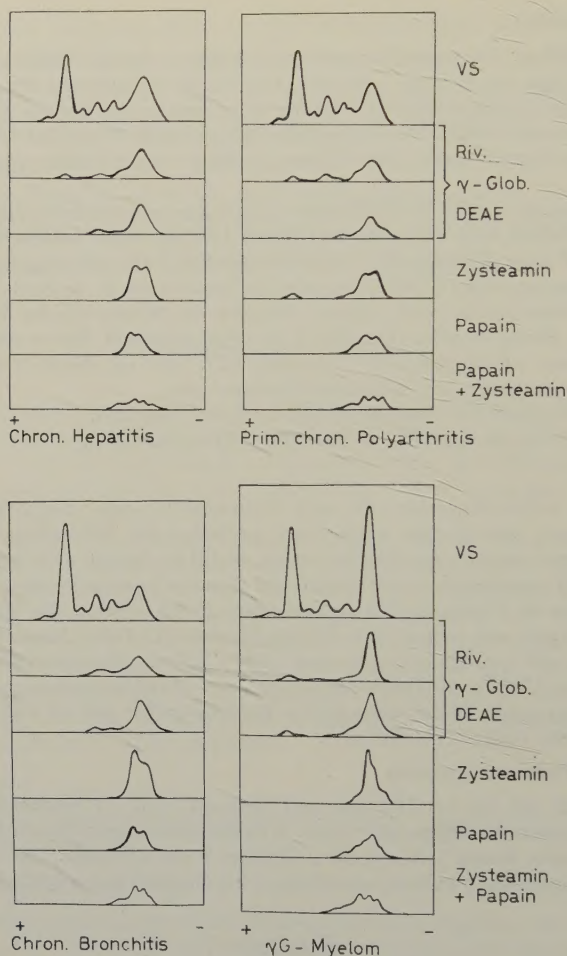


Abb. 1. Diagramme der elektrophoretischen Analysen auf Zelluloseazetatfolien der untersuchten Seren und deren γ -Globulinkomplexe.

grad der γ -Globulin-Fraktion wesentlich höher als im Falle etwa der primär chronischen Polyarthritits. Diese Feststellungen waren sowohl mit der Immunoelktrophorese als auch mit den relativ groben Methoden der Papier- und CAF-Elektrophorese zu treffen (Abb. 1).

Befunde nach Spaltung der γ -Globulinfraction durch Papaineinwirkung. Bei allen untersuchten Seren gelang die Darstellung von zwei Komponenten, die sich sowohl in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit als

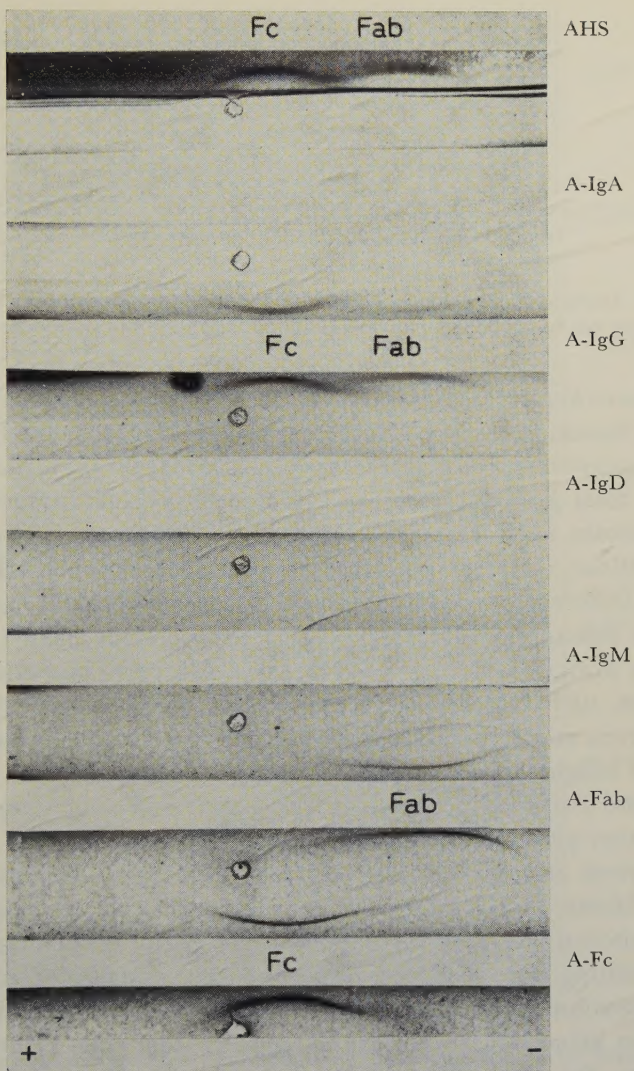


Abb. 2. Immunelektrophoretische Analysen des γ -G-Globulins des Serums einer chronischen Hepatitis; nach Behandlung mit Papain.

auch in ihren immunologischen Eigenschaften (Kreuzungsphänomen) voneinander unterschieden. Sie entsprachen, wie mit monoklonalen Antiseren bewiesen werden konnte, den Fc- (H-chains) bzw. den Fab- (L-chains) Fragmenten (Abb. 2). Im Falle des hier analysierten γ -G

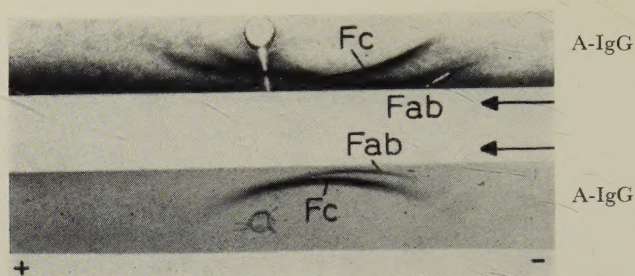


Abb. 3. Immunelektrophoretische Befunde der γ -G-Myelom-Fraktion: Oben nach Behandlung mit Papain, unten nach Einwirkung von Papain und Zysteamin.

Myeloms konnte zwischen dem typischen Fc-Fragment und dem ebenfalls charakteristischen Fab-Fragment eine zusätzliche Komponente wahrgenommen werden, die sowohl das Fc- als auch das Fab-Präzipitat total kreuzte (Abb.3). Mit der CAF-Elektrophorese war das γ -Globulin nach Papaineinwirkung als ein relativ breiter Komplex darstellbar, der seinerseits zwei bis drei Subfraktionen erkennen liess. Eine Differenzierung in γ -Globulin Komponenten mit exakt definierbaren elektrophoretischen Beweglichkeiten gelang nicht (Abb.1).

Im übrigen ist bemerkenswert, dass die vergleichsweise mit angesetzten, nicht gespaltenen Vollseren bei Verwendung monoklonaler Antiseren ebenfalls eine Differenzierung in H- und L-Ketten zulassen, wobei lediglich die elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschiede der Fc- und Fab-Fragmente nicht so deutlich in Erscheinung treten. Sie sind aber prinzipiell nachweisbar (Abb.4).

Befunde nach Spaltung der γ -Globulinfraktion durch Zysteamineinwirkung. Hier konnte in den Fällen mit chronischer Hepatitis sowie der primär chronischen Polyarthrit ebenfalls ein Spaltungsphänomen mit der Darstellung von zwei Komponenten mit unterschiedlicher Wandergeschwindigkeit festgestellt werden, wobei die beiden Komponenten keine sichere Kreuzung, sondern nur eine Teilidentität aufwiesen. Sie entsprachen aber wiederum den H- und L-Ketten der γ -G Fraktion, wie dies unter Verwendung monoklonaler Antiseren gezeigt werden konnte (Abb.5).

Bei dem Serum mit γ -G-Myelom konnte eine sichere Aufspaltung nicht erzielt werden. Stattdessen zeigte sich eine Doppelung der Präzipitationslinien des γ -G-Globulins, die im gleichen Masse mit dem polyvalenten Antiserum, dem anti- γ -G-Serum sowie mit monoklonalen Antiseren gegen H-, nicht aber gegen L-Ketten auspräzipitierte.

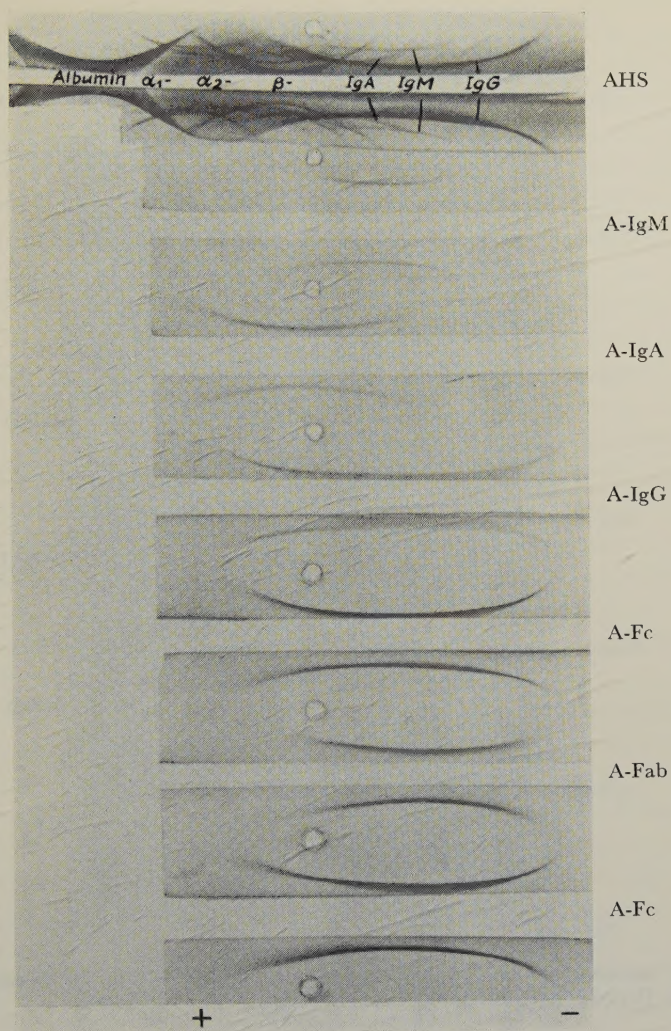


Abb. 4. Immunelektrophoretischer Analysensatz des unbehandelten (Voll-) Serums des Patienten mit chronischer Hepatitis, unter Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums (AHS) sowie verschiedener monovalenter Antiseren gegen die bekannten Immunglobulinklassen und gegen H- und L-Ketten (von IgG).

Befunde nach Spaltung der γ -Globulinfraktion durch Papain und Zysteamin-einwirkung. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe entsprachen im wesentlichen den Befunden allein nach Papaineinwirkung; d.h. es zeigte sich in allen Fällen eine Aufspaltung des γ -Globulin-Komplexes in

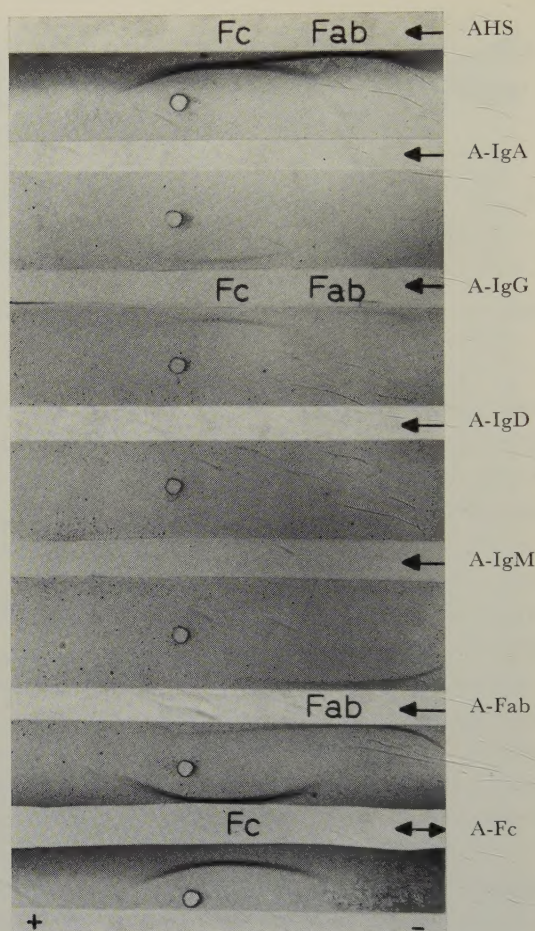


Abb. 5. Immunelektrophoretischer Analysensatz des γ -G-Globulins des Serums einer chronischen Hepatitis nach Behandlung mit Zysteamin.

zwei Komponenten: Die Fraktion näher der Auftragestelle entsprach den H-Ketten, die näher der Kathode gelegene den L-Ketten. Es ergab sich jedoch mit Regelmässigkeit ein auffälliges Phänomen, nämlich die Feststellung, dass bei Reaktion des gespaltenen Komplexes gegen das monovalente γ -G-Globulin jeweils nur die Komponente der H-Ketten zur Darstellung gelangte, nicht aber die der L-Ketten (Abb. 6).

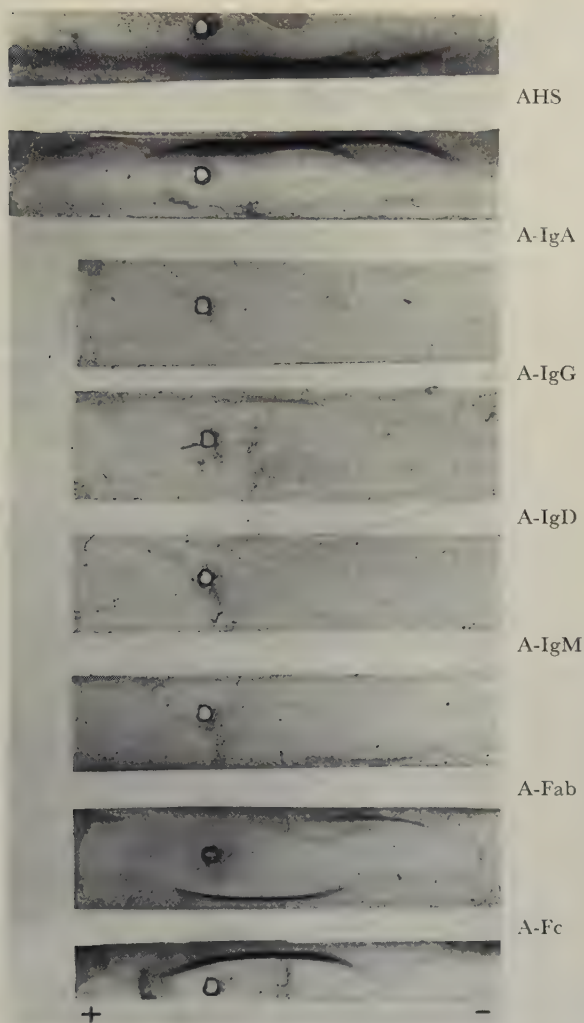


Abb. 6. Immunelektrophoretischer Analysensatz des γ -G-Globulins des Serums einer chronischen Hepatitis nach Behandlung mit Papain und Zysteamin.

Diskussion

Die Befunde der vorliegenden Serumanalysen nach Papain-Einwirkung mit der Darstellung von zwei Komponenten mit unterschiedlichen elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften, wie sie regelmässig in den vorgegebenen γ -Globulin-Komplexen nachzu-

weisen waren, bestätigen die seit PORTER [37] erzielten gleichartigen Ergebnisse [1, 3, 5, 9, 10, 13, 14, 18, 52, 54]. Bekanntlich entspricht die eine der beiden Komponenten, und zwar die der Kathode näher gelegene, dem sogenannten Fab-Fragment, das seinerseits zur Hauptsache aus L-Ketten und zu einem kleinen Teil aus H-Ketten besteht [14, 15, 54]. Die andere Komponente, die der Auftragestelle näher gelegen ist, entspricht dem sogenannten Fc-Fragment, das ausschliesslich aus H-Ketten besteht.

Die ersten Untersuchungen über derartige, durch fermentive Aufschliessung von γ -Globulinen gewonnenen Spaltprodukten, sind erstmals von PORTER [37] an Seren immunisierter Tiere vorgenommen worden, ohne dass damals die Bedeutung dieser Bruchstücke mit Bezug auf eine Spezifizierung der γ -Globulinfraktionen in verschiedene Immunglobulin-Klassen schon klar erkannt worden wäre. Dank der in den letzten Jahren erfolgten chemischen und immunchemischen Aufklärungsarbeit an diesen Spaltprodukten [5, 6, 10, 14, 15, 16, 32, 38, 39, 40], wissen wir heute, dass jedes Immunglobulin-Molekül aus zwei klassenspezifischen H-Ketten und zwei L-Ketten bestimmter Prägung ($K=I$ oder $L=II$) besteht [9, 10, 13, 14, 15, 16, 28, 33, 39, 47, 54]. Dabei sind die L-Ketten allen Immunglobulinen gemeinsam, zumindest untereinander immunologisch verwandt, während die H-Ketten durch die klassenspezifischen Merkmale α (IgA), γ (IgG), μ (IgM), δ (IgD) und ϵ (IgE) ausgezeichnet sind. Die L-Ketten kommen in zwei verschiedenen Typen (I oder II, s.o.) vor, wobei jedes Immunglobulin-Molekül entweder zwei L-Typ I-Ketten oder zwei L-Typ II-Ketten besitzt. In einem Individuum lassen sich aber sowohl Moleküle mit L-Ketten vom Typ I als auch Moleküle mit L-Ketten vom Typ II nachweisen, wobei das Verhältnis von Typ I zu Typ II von Immunglobulinklasse zu Immunglobulinklasse unterschiedlich angegeben wird [in 47, in 54].

Diese Kenntnisse über Struktur und Funktion der Immunglobuline haben zu völlig neuen Aspekten auch in der klinischen Medizin geführt. Sie erlangen insbesondere Bedeutung bei der Aufklärung von Anomalien im Bereich der γ -Globuline bzw. für die Eruierung von Strukturänderungen innerhalb eines γ -Globulin-Moleküls bei Paraproteinosen [11, 18, 23]. Unter der Voraussetzung, dass in Zukunft spezifische monovalente Antiseren gegen H- und L-Ketten zur Verfügung stehen werden, und dass unter Umständen der methodische Aufwand des fermentativen Spaltungsprozesses auf klinische Routine-

Ansprüche abgestimmt oder sogar entbehrlich werden kann, stellt diese γ -Globulin-Analyse eine wesentliche Bereicherung für die Paraprotein- und wahrscheinlich auch für die allgemeine γ -Globulin-Diagnostik pathologischer Seren dar.

Inzwischen gesammelte Erfahrungen und weitere Erkenntnisse an pathologischen menschlichen Seren, wie sie das Schrifttum aufweisen, haben gezeigt, dass sowohl bei den Paraproteinen als auch bei den stark vermehrten γ -Globulinen im Rahmen anderer Erkrankungen (Hepatitis, primär chronische Polyarthrit, Retikulosen und andere maligne Systemerkrankungen) die meisten Strukturveränderungen an die H-Ketten gebunden sind [1, 3, 43, 52.] Bei Paraproteinen finden sich Anomalien aber an H- und L-Ketten [43]. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren Krankheitsfälle beschrieben, welche durch ein Syndrom mit Paraproteinämie, Paraproteinurie und Hepatosplenomegalie gekennzeichnet sind [17, 34]. Auf Grund von Strukturanalysen dieser Paraproteine durch FRANKLIN [17] konnte gezeigt werden, dass bei dieser Paraproteinämie die atypische Eiweissfraktion nur aus strukturveränderten H-chains aufgebaut ist. Nach seinem Entdecker wird dieses Syndrom seither Franklin-Syndrom, die Krankheit H-Ketten-Krankheit genannt. Gewissermassen das Pendant zur «H-chain-disease» stellt die Bence-Jones-Paraproteinämie mit Paraproteinurie als klinisches Syndrom dar. Hier bestehen die Paraproteine-moleküle nur aus L-Ketten.

Nach heutiger Kenntnis ist die γ -Globulin-Synthese der verschiedenen Immunglobulin-Klassen an ganz bestimmte Zellklone gebunden [4]. Möglicherweise erfolgt sogar die Polypeptidketten-Bildung klonal und somit isoliert, so dass H- und L-Ketten erst sekundär zu klassenspezifischen Ig-Systemen komplettiert werden müssen.

In vorliegender Arbeit standen die vorgenannten monovalenten Antiseren gegen die verschiedenen Ig-Klassen sowie gegen H-Ketten von IgG und gegen L- (Typ I und Typ II) -Ketten von Bence-Jones-Proteinen zur Verfügung. Die darstellbaren Bruchstücke nach Papain- und Zysteamin-Einwirkung konnten damit exakt identifiziert werden. Erwähnenswert erscheint ein Befund bei Analyse des γ -G-Myelomproteins, wobei eine zusätzliche Präzipitationslinie mit – wenn auch geringer, aber dennoch definierbarer – unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit zwischen Fab- und Fc-Fragment wahrgenommen werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden an den Immunglobulinen von Versuchstieren gemacht. Eine genaue Zuordnung

des in der vorliegenden Analysenreihe beobachteten Präzipitationsphänomens zu einer immunchemisch definierbaren γ -Molekül-Komponente gelang nicht. Möglicherweise handelt es sich um eine Variante des Fd-Fragments. Nachdem in den übrigen untersuchten pathologischen Seren eine derartige Fraktion nicht nachgewiesen werden konnte, darf angenommen werden, dass es sich um eine Besonderheit des Paraproteins handelt.

Die mit Zysteamin behandelten gleichen Seren, deren Spaltprodukte prinzipiell anderer Art sein sollten, als diejenigen nach Papain-spaltung, ergaben überraschenderweise «phänomenologisch» ähnliche Präzipitate, d.h. eine schneller wandernde und eine näher der Kathode zugewandte Linie, wie das auch bei Papainspaltung wahrgenommen werden konnte. Mit einem polyvalenten Antiserum stellten sich allerdings die beiden Präzipitate nicht mit einem Kreuzungsphänomen dar, sondern zeigten Teilidentität. Diese Befunde bestätigen Beobachtungen, wie sie auch von anderer Seite [28, 30, in 47] mitgeteilt wurden.

Die Feststellung schliesslich, dass auch an nicht gespaltenen γ -Globulinen bzw. an unbehandelten Vollseren unter Verwendung monoklonaler Antiseren, eine Differenzierung des Ig-Systems und darüber hinaus sogar der isolierte Nachweis von H- und L-Ketten möglich ist, dürfte für die zukünftigen Routine-Untersuchungen an γ -Globulinen nicht nur im Forschungslaboratorium sondern auch für das klinische Labor eine wertvolle Bereicherung darstellen. Für die monoklonalen Ig-Fraktionen ist dies bereits eine geläufige Methode zur Differenzierung der γ -Globuline geworden. [43]. Mit immunchemischer Technik gelingt es darüber hinaus, die einzelnen Globulinfraktionen *quantitativ* zu bestimmen [12, 31, 49, 51]. Es wird in naher Zukunft möglich sein, auch H- und L-Ketten-Relationen quantitativ zu erfassen.

Über die diagnostisch verwertbare Anwendung monoklonaler Antiseren gegen H- und L-Ketten liegen bislang allerdings nicht genügend praktische Erfahrungen vor. Eigene Untersuchungen an insgesamt 160 pathologischen Seren mit γ -Globulin-Varianten lassen eine sichere Differenzierung in H-, L- und Bence-Jones-Typen auch am nicht gespaltenen γ -Globulin zu [43].

Prinzipiell konnten die vorliegenden Analysen und deren Befunde zeigen, dass γ -Globuline durch Einwirkung von Papain bzw. Zysteamin, ungeachtet ihrer krankheitsspezifisch verursachten Anreicherung, grundsätzlich gleichartige Spaltprodukte aufweisen, was auf einen

gleichartigen Bauplan der pathologischen wie der physiologischen γ -Globuline schliessen lässt. Paraproteine zeigen dabei gewisse Strukturänderungen, die offenbar an den H-Ketten fassbar werden.

Zusammenfassung

Die γ -Globuline der Seren von 4 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (chronische Hepatitis, primär chronische Polyarthritis, chron.-rezidivierende Asthma-Bronchitis, γ -G-Myelom) wurden durch fermentative Spaltung mit Papain sowie Behandlung mit Zysteamin und nachfolgende immunologische Differenzierung analysiert. Verwendet wurden monoklonale Anti-Polypeptidketten-Seren zur vergleichenden Beurteilung der Spaltprodukte der verschiedenen γ -Globuline. In jedem Fall war eine Spaltung in H- und L-Ketten möglich. Bei einem γ -Myelom war das spezifische Paraprotein-Präzipitat an die H-Ketten gebunden. Es war ausserdem ein zusätzliches, H-Ketten-spezifisches Präzipitat nachweisbar. Die Differenzierung in H- und L-Ketten ist sowohl am gespaltenen γ -Globulin als auch an nicht behandelten Vollseren möglich.

Summary

The γ -globulins of sera of 4 patients with different diseases (chronic hepatitis, primary chronic rheumatoid arthritis, chronic bronchial asthma, γ -G-myeloma) but all with hypergammaglobulinemia, have been analyzed by enzymatic cleavage by papain as well as by cysteamine and immunochemical differentiation using monoclonal antisera against polypeptide chains for comparing the γ -globulin split products. A cleavage into H- and L-chains was possible in every case. In the γ -myeloma the paraprotein precipitate was joint to the H-chains. Moreover in this case of paraproteinemia another H-chain specific split could be demonstrated. H- and L-chains could be demonstrated in the cleaved gamma globulin prepareate as well as in the not treated patients' sera, using monoclonal antisera against H- and L-chains.

Literatur

1. BALLIEUX, R. E.; BERNIER, G. M.; TOMINAGA, K., and PUTNAM, F. W.: γ -Globulin antigenic types defined by heavy chain determinants. *Science* 145: 168 (1964).
2. BERGGARD, I.: Studies on the plasma proteins in normal human urine. *Clin. chim. Acta* 6: 413 (1961).
3. BERNIER, G. M.; BALLIEUX, R. E.; TOMINAGA, K. T., and PUTNAM, F. W.: Heavy chain subclasses of human γ -G globulin. *J. exp. Med.* 125: 303 (1967).
4. BURNET, F. M.: The clonal selection theory of acquired immunity. (Cambridge Univ. Press., London 1950).
5. CECIL, R. and STEVENSON, G. T.: The disulfide bonds of human and rabbit γ -globulins. *Biochem. J.* 97: 569 (1965).
6. COHEN, S.: Properties of the peptide chains of normal and pathological human γ -globulins. *Biochem. J.* 89: 334 (1963).
7. DEUTSCH, H. F.: Molecular transition of a γ_{1-A} type human serum globulin. *Fed. Proc.* 21/2: 77 (1962).
8. DEUTSCH, H. F. and MORTON, J. I.: Dissociation of human serum macroglobulins. *Science* 125: 600 (1957).
9. EDELMAN, G. M. and POULIK, M. D.: Studies on structural units of the γ -globulins. *J. exp. Med.* 113: 861 (1961).

10. EDELMAN, G. M.; HEREMANS, J. F.; KUNKEL, H. G., and HEREMANS, M. TH.: Immunological studies of human γ -globulin. *J. exp. Med.* 112: 203 (1960).
11. FAHEY, J. L.: Heterogeneity of myeloma proteins. *J. clin. Invest.* 42: 111 (1963).
12. FAHEY, J. L. and MCKELVEY, E. M.: Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar-plates. *J. Immunol.* 94: 84 (1965).
13. FLEISCHMAN, J. B.; PAIN, R. H., and PORTER, R. R.: Reduction of gamma globulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, suppl. 1: 174 (1962).
14. FLEISCHMAN, J. B.; PORTER, R. R., and PRESS, E. M.: The arrangement of the peptide chains in γ -globulin. *Biochem. J.* 88: 220 (1963).
15. FOUGEREAU, M.; EDELMAN, D. V. M., and EDELMAN, G. M.: Corroboration of recent models of the γ -G immunoglobulin molecule. *J. exp. Med.* 121: 373 (1964).
16. FRANKLIN, E. C.: Structural units of human 7 S γ -globulin. *J. clin. Invest.* 39: 1933 (1960).
17. FRANKLIN, E. C.; LOWENSTEIN, J.; BIGELOW, B., and MELTZER, M.: Heavy chain disease - a new disorder of serum γ -globulins. *Amer. J. Med.* 37: 332 (1964).
18. FRANKLIN, E. C. and STANWORTH, D. R.: Antigenic relationships between immune globulins and certain paraproteins in man. *J. exp. Med.* 114: 521 (1961).
19. GÖTZ, H.; PEREZ-MIRANDA und SCHEIFFARTH, F.: a) Antigeneigenschaften des C-reaktiven Proteins. *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* 7/3: 275 (1969); b) Newer findings about C-reactive protein. 17th Coll. Protides of the Biol. Fluids (Brügge, 1969).
20. GRABAR, P. und BURTIN, P.: Immunelektrophoretische Analyse (Elsevier, Amsterdam 1964).
21. GRABAR, P. et WILLIAMS, C. A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. *Biochim. biophys. Acta* 10: 193 (1953).
22. GRASSMANN, W.; HANNIG, K. und KNEDEL, M.: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filterpapier. *Dtsch. med. Wschr.* 76: 333 (1951).
23. GREY, H. M. and KUNKEL, H. G.: H-chain subgroups of myeloma proteins and normal 7 S γ -globulin. *J. exp. Med.* 120: 253 (1964).
24. HEIMBURGER, N. und SCHMIDTBERGER, R.: Moderne Verfahren der Chromatographie und Elektrophorese zur Präparation von Plasmaproteinen. *Behringwerkmitt.*, Heft 43: 83 (1964).
25. HOREJŠI, J. and SMETANA, R.: Isolation of γ -globulin from blood serum by Rivanol. *Acta med. scand.* 155: 65 (1956).
26. ISHIZAKA, K. and ISHIZAKA, T.: (a) Physicochemical properties of reaginic antibody. I. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than γ -A- or γ -G-globulin. *J. Allergy* 37: 169 (1966); (b) Effect of reduction and alkylation on allergen-combining properties of reaginic antibody. *J. Allergy* 37: 135 (1966).
27. ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. and HORNBROOK, M. M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 97: 75 (1966).
28. KAMINSKI, M.: The analysis of the antigenic structure of protein molecules. *Progr. Allergy* 9: 79 (1965).
29. KOHN, J.: (a) New supporting medium for zone electrophoresis. *Biochem. J.* 65: 9 (1957); (b) A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin. chim. Acta* 2: 297 (1957); (c) Zur Technik der CAF-Elektrophorese. *Ärzt. Laborat.* 10: 233 (1964).
30. MACPHERSON, C. F. and SAFFRAN, M.: An albumin and γ -globulin characteristic of bovine cerebrospinal fluid. *J. Immunol.* 95: 629 (1965).
31. MANCINI, G.; CARBONARA, A. O., and HEREMANS, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2: 235 (1965).

32. MARLER, E.; NELSON, C. A., and TANFORD, C.: The polypeptide chains of rabbit γ -globulin and its papain cleaved fragments. *Biochem. 3/2*: 279 (1964).
33. Nomenclature for human immunoglobulins: (a) *Bull. World Hlth. Ass.* 30: 447 (1964); (b) Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin. *Immunochem. 5*: 377 (1968).
34. OSSERMANN, E. F. and TAKATSUKI, K.: Clinical and immunochemical studies of four cases of heavy (H2) chain disease. *Amer. J. Med.* 37: 351 (1964).
35. PÉREZ-MIRANDA, M. and GÖTZ, H.: C-reactive protein a normal immunoglobulin? *Lancet ii*: 1305 (1968).
36. PETERSON, E. A. and SOBER, H. A.: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. amer. chem. Soc.* 78: 751 (1956).
37. PORTER, R. R.: The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73: 119 (1959).
38. PORTER, R. R. and PRESS, E. M.: Immunochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 31: 625 (1962).
39. PUTNAM, F. W.; EASLEY, C. W. and LYNN, L. T.: Site of cleavage of γ -globulins by papain. *Biochim. biophys. Acta* 58: 279 (1962).
40. ROWE, D. S.: The separation and antigenic characteristics of some fractions of papain digests of human serum γ -globulins. *Immunology* 5: 533 (1962).
41. ROWE, D. S. and FAHEY, J. L.: A new class of human immunoglobulins. I. A unique myeloma protein. *J. exp. Med.* 121: 185 (1965).
42. SCHEIDEGGER, J. J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7: 103 (1955).
43. SCHEIFFARTH, F. und GÖTZ, H.: γ -Globulin-Differenzierung mit monovalenten Antisera. *Klin. Wschr.* 46: 1165 (1968).
44. SCHEIFFARTH, F.; BERG, G. und GÖTZ, H.: Papierelektrophorese in Klinik und Praxis. (Urban u. Schwarzenberg, München/Berlin/Wien 1962).
45. SCHEIFFARTH, F.; GÖTZ, H. und ZICHA, L.: Reindarstellung von γ -Globulin mit Rivanol. *Z. Immun. Forsch.* 115: 92 (1958).
46. SCHEIFFARTH, F.; PÉREZ-MIRANDA, M. und GÖTZ, H.: Nachweis des C-reaktiven Proteins in normalen Seren (im Druck).
47. SCHULTZE, H. E. and HEREMANS, J. F.: Molecular biology of human proteins (Elsevier, Amsterdam/London/New York 1966).
48. SCHULTZE, H. E.; SCHWICK, G.; SONNET, J.; HEREMANS, J. F. und MICHAUX, J. L.: γ -X-Globulin, eine immunoelktrophoretisch nachweisbare γ -Globulinkomponente mit Beziehungen zum C-reaktiven Protein. *Klin. Wschr.* 38: 62 (1960).
49. SCHWICK, G. und STÖRIKO, K.: Qualitative und quantitative Plasmaprotein-Bestimmung durch Immunpräzipitation. *Laborat. Bl. Behringwerke* 5 (1964).
50. SOBER, H. A.; GUTTER, F. J.; WYCKHOFF, M. M., and PETERSON, E. A.: Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum protein on anion-exchange cellulose. *J. amer. chem. Soc.* 78: 756 (1956).
51. STÖRIKO, K.: Immunologische Methoden zur Bestimmung von Plasmaproteinen. *Ärzt. Laborat.* 11: 189 (1965).
52. TERRY, W. D. and FAHEY, J. L.: Subclasses of human γ_2 -globulin based on differences in the heavy polypeptide chains. *Science* 146: 400 (1964).
53. TISCHENDORF, F. W.; SCHEURLLEN, P. G. und KALLEE, E.: Dissoziation des γ_1 -Makro-globulins durch Zysteamin. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 70: 223 (1964).
54. WEIR, D. M.: Handbook of experimental immunology (Blackwell, Oxford/Edinburgh 1967).

Adresse der Autoren: Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH, Priv.-Doz. Dr. H. GÖTZ und Dr. R. SCHUBERT, Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg, Krankenhausstrasse 12, D-852 Erlangen (Deutschland).

Lebenslauf

Am 14. 6. 1942 wurde ich als drittes Kind des Gesandtschaftsreferenten Gerhard Schubert und seiner Frau Barbara geb. Baroness Maydell in Berlin geboren. Während des Krieges zogen wir nach Westpreußen, von wo meine Mutter mit den vier Kindern 1945 nach Wolfshagen im Harz floh. Im selben Jahr kam ich zu Bekannten nach Schüttorf, wo ich 1948 eingeschult wurde. 1951 kehrte ich zu meinen Eltern zurück und bestand 1952 die Aufnahmeprüfung für die Oberschule in Goslar. Im Jahre 1957 folgte die Familie dem Vater, der in Eßlingen/N. eine Stelle als Heimleiter eines internationalen Jugendwohnheims antrat. In Eßlingen besuchte ich das Georgii-Gymnasium bis zum Abitur, das ich 1964 ablegte. Anschließend wurde ich für ein Jahr zur Bundeswehr eingezogen.

Zum Sommersemester 1965 erhielt ich einen Studienplatz für die Humanmedizin in Erlangen. Dort legte ich das Vorphysikum nach dem Wintersemester 1965/66 und das Physikum nach dem Sommersemester 1967 ab.

Das Staatsexamen der Humanmedizin beendete ich im Februar 1971.

Im Februar 1971

Rainer Schubert

